

Requested Patent: WO9809154A1

Title:

SYSTEM FOR DISTINGUISHING FLUORESCENT MOLECULE GROUPS BY TIME  
RESOLVED FLUORESCENCE MEASUREMENT ;

Abstracted Patent: US6140048 ;

Publication Date: 2000-10-31 ;

Inventor(s):

MUELLER RALPH (DE); SAUER MARKUS (DE); ZANDER CHRISTOPH (DE) ;

Applicant(s): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (DE) ;

Application Number: US19980065103 19980522 ;

Priority Number(s): DE19961034873 19960829; WO1997EP04665 19970827 ;

IPC Classification:

C12Q1/68 ; G01N33/53 ; C12M1/00 ; G02B21/00 ; B01D59/44 ;

Equivalents: DE19634873, EP0857300 (WO9809154), JP2000500874T

ABSTRACT:

PCT No. PCT/EP97/04665 Sec. 371 Date May 22, 1998 Sec. 102(e) Date May 22, 1998 PCT Filed Aug. 27, 1997 PCT Pub. No. WO98/09154 PCT Pub. Date Mar. 5, 1998 System and method for distinguishing at least two types of molecule groups that are bound to analyte molecules and which have different fluorescent characteristics. The system performs differentiation using time-resolved fluorescence measurement and includes a light source that exposes a first sample volume to light that is suitable for exciting the at least two types of molecule groups to fluorescence. The system also includes a detector for detecting fluorescence radiation emitted from a second sample volume that at least partially overlaps the first sample volume, and a control unit that is designed to activate the light source for a time interval T1 and, after time interval T2 has passed, to activate the detector for a time interval T3. According to this system, the illumination and detection of emitted fluorescence radiation is performed at least 1,000 times per millisecond, the detector signals recorded with a recording unit during time interval T3 are evaluated using an evaluation unit, and the signal over time during time interval T3 is used to determine which of the at least two groups of molecules is contained in the overlapping sample volume.

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>G01N 21/64, 33/533</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/09154</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>5. März 1998 (05.03.98)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/04665</b> (22) Internationales Anmeldedatum: <b>27. August 1997 (27.08.97)</b>  (30) Prioritätsdaten: 196 34 873.0        29. August 1996 (29.08.96)        DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Ralph [DE/DE]; Kastanienweg 10, D-74722 Buchen (DE). SAUER, Markus [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 253, D-69120 Heidelberg (DE). ZANDER, Christoph [DE/DE]; Am Kochsfeld 12, D-57258 Freudenberg (DE).  (74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: SYSTEM FOR DISTINGUISHING FLUORESCENT MOLECULE GROUPS BY TIME RESOLVED FLUORESCENCE MEASUREMENT

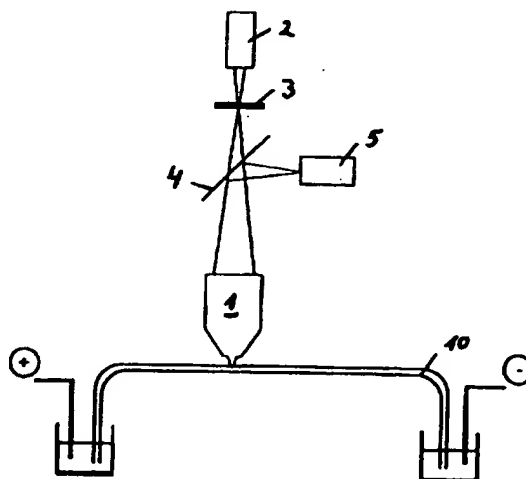
(54) Bezeichnung: SYSTEM ZUR UNTERSCHIEDUNG FLUORESZIERENDER MOLEKÜLGRUPPEN DURCH ZEITAUFGELÖSTE FLUORESZENZMESSUNG

(57) Abstract

A system and process are disclosed for distinguishing at least two types of molecule groups having a different degree of fluorescence and bound to an analyte molecule by time resolved fluorescence measurement. A light source (5) irradiates a first sample volume with light suitable for exciting the fluorescence of the at least two types of molecule groups. A detector (2) detects the fluorescent radiation emitted by a second sample volume which at least partially overlaps the first sample volume. A control unit is designed to activate the light source for a time interval  $T_1$  and to activate the detector for a time interval  $T_3$  after a time interval  $T_2$  has elapsed. The irradiation and detection of emitted fluorescent radiation are carried out at least 1000 times per millisecond. The detector signals recorded by a recording unit during the time intervals  $T_3$  are evaluated by an evaluation unit. The molecule groups contained in the overlapping sample volume are determined from the variation in time of the signals during the time interval  $T_3$ .

(57) Zusammenfassung

System und Verfahren zur Unterscheidung von mindestens zwei unterschiedlich fluoreszierenden Arten von Molekülgruppen, die an Analytmoleküle gebunden sind, durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung mit einer Lichtquelle (5), die ein erstes Probevolumen mit Licht bestrahlt, das geeignet ist, die mindestens zwei Arten von Molekülgruppen zur Fluoreszenz anzuregen, sowie mit einem Detektor (2) zur Detektion von aus einem zweiten, mit dem ersten Probevolumen zumindest teilweise überlappenden Probevolumen emittierter Fluoreszenzstrahlung und mit einer Steuereinheit, die dazu ausgelegt ist, die Lichtquelle für ein Zeitintervall  $T_1$  zu aktivieren und nach Verstreichen eines Zeitintervalls  $T_2$  den Detektor für ein Zeitintervall  $T_3$  zu aktivieren, wobei die Bestrahlung und Detektion emittierter Fluoreszenzstrahlung mindestens 1000fach pro Millisekunde durchgeführt wird, die während der Zeitintervalle  $T_3$  mit einer Aufnahmeeinheit aufgenommenen Detektorsignale durch eine Auswerteeinheit ausgewertet werden und aus den zeitlichen Signalverläufen im Zeitintervall  $T_3$  ermittelt wird, welche der mindestens zwei Molekülgruppen im überlappenden Probevolumen enthalten ist.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	R	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **System zur Unterscheidung fluoreszierender Molekülgruppen durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein System zur Unterscheidung von mindestens zwei unterschiedlich fluoreszierenden Arten von Molekülgruppen, die an Analytmoleküle gebunden sind, durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung mit einer Lichtquelle, die ein erstes Probevolumen mit Licht bestrahlt, das geeignet ist, die mindestens zwei Arten von Molekülgruppen zur Fluoreszenz anzuregen sowie mit einem Detektor zur Detektion von aus einem zweiten, mit dem ersten Probevolumen zumindest teilweise überlappenden Probevolumen emittierter Fluoreszenzstrahlung und mit einer Steuereinheit, die dazu ausgelegt ist, die Lichtquelle für ein Zeitintervall  $T_1$  zu aktivieren und nach Verstreichen eines Zeitintervalls  $T_2$  den Detektor für ein Zeitintervall  $T_3$  zu aktivieren, wobei die Bestrahlung und Detektion emittierter Fluoreszenzstrahlung mindestens 1000fach pro Millisekunde durchgeführt wird, die während der Zeitintervalle  $T_3$  mit einer Aufnahmeeinheit aufgenommenen Detektorsignale durch eine Auswerteeinheit ausgewertet werden und aus den zeitlichen Signalverläufen im Zeitintervall  $T_3$  ermittelt wird, welche der mindestens zwei Molekülgruppen im überlappenden Probevolumen enthalten ist.

Die vorliegende Erfindung fällt in das Gebiet der chemischen Analytik durch Detektion angeregter Fluoreszenzstrahlung. Derartige analytische Verfahren haben sehr breite Anwendungsmöglichkeiten, wobei jedoch in letzter Zeit stärker das Anwendungsgebiet der Biochemie in den Vordergrund tritt. Insbesondere kann die Detektion von Fluoreszenzstrahlung herangezogen werden, eine Sequenzierung von Nukleinsäuren vorzunehmen, wie beispielsweise in EP-B-0 157 280 beschrieben. Bei diesem Verfahren zur Sequenzierung werden klonierte DNA-Stränge hergestellt, von denen Fragmente gebildet werden, deren Ende mit Basen A, G, C und T versehen sind, die fluoreszierend markiert sind. Weiterhin sind im Stand der Technik Apparaturen bekannt, wie beispielsweise in US-5,252,834 beschrieben, mit denen es über eine geeignete zeitliche Abstimmung des Anregungslichtes und des detektierten Fluoreszenzlichtes möglich ist, unerwünschte Hintergrundstrahlung auszu-

schließen. Die in US-5,252,834 beschriebene Apparatur verwendet jedoch eine apparativ aufwendige spektrale Analyse der emittierten Fluoreszenzstrahlung, um Analytmoleküle zu identifizieren.

In der EP-A-0 563 998 wird bereits ein Verfahren zur Detektion von Biomolekülen beschrieben, das auf einer zeitaufgelösten Laserspektroskopie basiert. Das hier beschriebene Verfahren basiert darauf, daß die nachzuweisenden Moleküle durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden, die unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauern besitzen. Die Fluoreszenzlebensdauern werden durch eine zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie voneinander unterschieden, wobei zur Unterdrückung von Hintergrundstrahlung die emittierte Fluoreszenz gegenüber dem Anregungslicht zeitlich verzögert detektiert wird.

Die beschriebenen Verfahren und Vorrichtungen des Standes der Technik basieren darauf, daß eine größere Zahl von Molekülen gleicher Fluoreszenzeigenschaften vorhanden sind, so daß ein Nachweis und eine Charakterisierung der fluoreszierenden Moleküle möglich ist. Um dies zu erreichen, müssen entweder ausreichend hohe Molekülkonzentrationen vorhanden sein oder es muß ein ausreichend großes Probenvolumen bestrahlt werden. Beide Vorgehensweisen, die darauf abstellen, Fluoreszenzlicht von einer größeren Zahl von Molekülen zu empfangen, besitzen den Nachteil, daß das Molekülensemble nicht notwendigerweise homogen sein muß, d. h. daß gegebenenfalls Moleküle unterschiedlicher Fluoreszenzeigenschaften detektiert werden. Wird eine Auswertung der Fluoreszenzstrahlung gemäß der Fluoreszenzlebensdauer vorgenommen, so wird dem betrachteten Molekülensemble eine gemeinsame und daher gemittelte Fluoreszenzlebensdauer zugeordnet. Dies kann zu einem Versagen der Zuordnung bzw. zu einer Fehlinterpretation führen. Weiterhin besitzen die Verfahren des Standes der Technik den Nachteil, daß bei Vorhandensein von nur sehr wenigen Molekülen einer Sorte aufgrund statistischer Signalschwankungen sowie aufgrund geringer Signalintensitäten keine sichere Zuordnung zu einer Gruppe von Molekülen erfolgen kann.

Die vorgenannten Nachteile des Standes der Technik werden durch ein System zur Unterscheidung unterschiedlicher Arten fluoreszierender Molekülgruppen gemäß Anspruch 1 behoben. Insbesondere ist mit einem System der vorliegenden Erfindung eine sichere Unterscheidung und Zuordnung der untersuchten Moleküle zu bestimmten Gruppen auch dann

möglich, wenn nur wenige oder gar einzelne Moleküle im untersuchten Probevolumen vorhanden sind. Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, daß es geeignet ist, sehr kleine Probevolumina zu untersuchen. Dies eröffnet die Möglichkeit, Detektionssysteme, wie sie beispielsweise bei der DNA-Sequenzierung eingesetzt werden, stark zu miniaturisieren.

Im Bereich der chemischen Analytik haben sich Fluoreszenztechniken aufgrund ihrer Einfachheit und hohen Empfindlichkeit ein breites Anwendungsgebiet erschlossen. Insbesondere stehen bei der Fluoreszenzanalytik solche Verfahren im Vordergrund, bei denen nicht die Eigenfluoreszenz der Analytmoleküle ausgenutzt wird, sondern die Analytmoleküle zunächst spezifisch an geeignet fluoreszierende Molekülgruppen gebunden werden. Daher sind Fluoreszenztechniken, besonders in Verbindung mit immunologischen Assays oder Nukleinsäurenachweisen, von großer Bedeutung, da hier spezifisch immunologische Affinitäten oder selektive Hybridisierungseigenschaften von Oligonukleotiden an Analyt-Nukleinsäuren ausgenutzt werden können. Die spezifisch an den Analyten bindefähigen Substanzen, wie z. B. Antikörper oder Detektionsoligonukleotide, werden im Folgenden als Detektionsmoleküle bezeichnet. Sie sind ihrerseits direkt oder indirekt an fluoreszierende Molekülgruppen gebunden. Die fluoreszierenden Molekülgruppen können weitestgehend unabhängig von dem im jeweiligen Fall nachzuweisenden Analytmolekül und der spezifisch bindefähigen Substanz ausgewählt werden. Bevorzugt werden solche Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die günstige Eigenschaften, wie eine hohe Quantenausbeute, hohe Photostabilität und/oder einen geeigneten Absorptionsbereich aufweisen, ohne daß diese Auswahl wesentlichen Einschränkungen durch das jeweils nachzuweisende Analytmolekül unterworfen ist.

Fluoreszenztechniken sind in ihrer Empfindlichkeit hauptsächlich durch die Untergrundfluoreszenz der Probe und gegebenenfalls des Probenträgers limitiert. Erfindungsgemäß wird die Detektion emittierten Fluoreszenzlichtes erst vorgenommen, wenn nach der Fluoreszenzanregung eine vorgegebene Zeit verstrichen ist. Durch das Setzen eines Zeitfensters zwischen der Fluoreszenzanregung und der Detektion emittierter Fluoreszenz wird verhindert, daß die spontane Emission der Probe bzw. des Probengefäßes zum gemessenen Fluoreszenzsignal beiträgt. Das Zeitintervall  $T_2$  zwischen Bestrahlung des Probevolumens und Aktivierung des Detektors liegt bevorzugt zwischen 0,1 und 10 ns.

Eine weitere Maßnahme, die erfindungsgemäß zur Empfindlichkeitssteigerung vorgenommen wird, besteht darin, daß lediglich ein kleines Probenvolumen vorzugsweise zwischen 0,05 und 10 Femtoliter mit Licht bestrahlt wird, das geeignet ist, die fluoreszierenden Molekülgruppen anzuregen. Auf diese Weise kann verhindert werden, daß Fluoreszenz von außerhalb des untersuchten Bereiches zum Signal beiträgt. Herkömmliche Verfahren zur Fluoreszenzanalyse gehen davon aus, daß die emittierte Fluoreszenz von einem Molekülensemble ausgeht, das mehrere tausend oder mehrere hunderttausend Moleküle umfaßt. Hierdurch ist einerseits gewährleistet, daß die Signalintensität ausreichend hoch ist und weiterhin eine statistische Verteilung von Fluoreszenzlebensdauern sowie Fluoreszenzfrequenzen gegeben ist. Bei den erfindungsgemäß untersuchten sehr kleinen Probenvolumina liegen im bestrahlten Probenvolumen jedoch nur wenige Moleküle vor. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß eine statistische Auswertung der Fluoreszenzlebensdauer der bestrahlten Moleküle trotz der geringen Zahl von Molekülen möglich ist, indem das gleiche Probenvolumen mindestens 1000fach innerhalb einer Millisekunde bestrahlt und nach den Bestrahlungen die emittierte Fluoreszenzstrahlung ausgewertet wird. Dieses Erkenntnis steht im Widerspruch zu den in der einschlägigen Literatur vorherrschenden Ansichten. In dem Artikel "Single Molecule Detection in Capillary Electrophoresis: Molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis" in *Analytical Chemistry*, Band 68, Seiten 690 - 696 (1996) von D. Chen und N.J. Dovichi, wird beschrieben, daß für eine Fluoreszenzanalyse mindestens ein Ensemble von  $10^4$  Analytmolekülen vorhanden sein muß, um die durch statistische Schwankungen verursachte Impräzision auf unter 1 % zu senken. Mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann jedoch auch noch mit einem Ensemble bestehend aus weniger als  $10^4$  Molekülen eine verlässliche Unterscheidung der fluoreszierenden Molekülgruppen vorgenommen werden. Vorzugsweise besteht das Molekülensemble bei der vorliegenden Erfindung sogar aus einem oder wenigen Molekülen gleicher Sorte.

Die vorliegende Erfindung kann vorteilhaft im Bereich der klinischen Analytik, insbesondere im Bereich der Immunologie oder Nukleinsäureanalytik, angewandt werden. Analytmoleküle können demgemäß Antigene, Antikörper, Nukleinsäuren oder Fragmente davon sein. Allgemein kommen als Analytmoleküle jegliche Substanzen in Betracht, an die spezifisch Detektionsmoleküle gebunden werden können. Andererseits können auch die Analytmoleküle selbst erfindungsgemäß nachweisbare fluoreszierende Molekülgruppen enthalten oder an diese gebunden sein. Letzterer Fall tritt insbesondere bei einer Sequenzanalyse von

Nukleinsäuren auf. Beispielsweise ist in diesem Zusammenhang die nach Sanger benannte Methode der Sequenzanalyse zu nennen. Bei dieser Methode wird durch enzymatische Synthese der Gegenstrang zu einer zu sequenzierenden Nukleinsäure aufgebaut. Hierzu wird an eine einzelsträngige Nukleinsäure ein Primer hybridisiert, der unter Einbau von Mononukleotiden elongiert wird. Bei der Sequenzanalyse nach Sanger werden neben den gewöhnlichen Mononukleosid-Triphosphaten auch Mononukleotid-Analoga eingesetzt, die einen Kettenabbruch bewirken, d. h. daß nach ihrem Einbau eine weitere Elongation des Stranges unterbunden wird. Im Rahmen der Sequenzanalyse unter Zuhilfenahme der Fluoreszenzanalytik werden für den Kettenabbruch Mononukleotid-Analoga eingesetzt, die ein Fluoreszenzlabel enthalten. Dabei werden zur Unterscheidung der vier möglichen Mononukleotide unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Im Rahmen der Erfindung werden diese Fluoreszenzfarbstoffe durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung unterschieden und somit festgestellt, durch welche Base der jeweilige Nukleinsäurestrang terminiert ist.

Weiterhin kann die vorliegende Erfindung zur Durchführung von Nukleinsäurehybridisierungs-Assays eingesetzt werden. Bei einem bevorzugten Testformat wird zunächst eine unmarkierte Fangsonde, in der Regel ein Oligonukleotid, auf einer Oberfläche immobilisiert. Durch Inkubation mit einer Probeflüssigkeit findet eine Hybridisierung zwischen Fangsonde und Analyt (beispielsweise ein PCR-Produkt) statt. Im Falle eines fluoreszenzmarkierten Analyten kann dieser direkt nachgewiesen werden oder der Analyt wird seinerseits wiederum mit einer fluoreszenzmarkierten Nachweissonde detektiert.

Die vorliegende Erfindung kann weiterhin sehr vorteilhaft zum Nachweis und zur Unterscheidung fluoreszierender Moleküle in Kapillaren eingesetzt werden. Beispielsweise können Mikrokapillaren mit einem Innendurchmesser von 1 bis 2  $\mu\text{m}$  eingesetzt werden, durch die die zu untersuchende Flüssigkeit strömt. Zur Untersuchung wird eine Optik eingesetzt, die in einem Bereich der Mikrokapillare deren gesamten Querschnitt oder zumindest einen großen Teil davon erfaßt, so daß das Hindurchtreten eines fluoreszierenden Moleküls durch die Kapillare sicher erkannt wird. Mit einer derartigen Anordnung ist es beispielsweise möglich, einzelne Nukleinsäurestränge zu sequenzieren, indem Basen von einem Ende des Nukleinsäurestranges nacheinander abgespalten und unter Beibehaltung der Reihenfolge durch die Kapillare transportiert werden. Eine Verwendung des erfindungsge-



mäßen Systems ist weiterhin auch in Verbindung mit konventionellen Techniken, wie HPLC oder CGE, möglich.

Weiterhin unterscheiden sich die Farbstoffe, die voneinander unterschieden werden sollen, in ihrer Fluoreszenzlebensdauer. Als Fluoreszenzlebensdauer wird, wie allgemein üblich, die durchschnittliche Zeit bezeichnet, mit der sich ein angeregter Fluoreszenzfarbstoff im angeregten Zustand befindet. Der Übergang von diesem angeregten Zustand in einen energetisch tiefer liegenden Zustand erfolgt spontan und liegt in der Regel im Bereich von Nanosekunden. Da es sich bei dem energetischen Übergang des Moleküls um einen quantenmechanischen Prozeß handelt, ist die Fluoreszenzlebensdauer eines einzelnen Moleküls unbestimmt und der Bereich experimentell auftretender Fluoreszenzlebensdauern ist durch die Heisenbergsche Unschärferelation gegeben. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer einer Molekülsorte wird im Stand der Technik so verfahren, daß ein ausreichend großes Molekülensemble mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt und eine große Anzahl von Molekülen in den angeregten Zustand gebracht wird. Der Übergang der Moleküle in den Grundzustand verläuft im Regelfall nach einer Kinetik erster Ordnung, so daß ein exponentielles Zerfallsgesetz vorliegt. Durch Integration der zugrunde liegenden Differentialgleichung erhält man die Signalintensität in Abhängigkeit von der Zeit. Durch Auswertung des gemessenen Signal-Zeitverlaufes kann auf die Fluoreszenzlebensdauer zurückgeschlossen werden. Diese ist, sofern eine Kinetik erster Ordnung vorliegt, die Zeit, nach der die Fluoreszenzintensität auf  $1/e$  abgefallen ist. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß eine Ermittlung der Fluoreszenzlebensdauer auch für einzelne Moleküle möglich ist, wenn die Vorgehensweise geeignet gewählt wird. Eine Bestimmung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer erfolgt, indem ein und dasselbe Probenvolumen mindestens 1000fach innerhalb einer Millisekunde mit Licht bestrahlt wird, das geeignet ist, die fluoreszierende Molekülgruppe(n) anzuregen. Bei einer Auswertung der emittierten Fluoreszenzsignale wird davon ausgegangen, daß sich in dem bestrahlten Probenvolumen während jeder der Messungen Moleküle der gleichen Sorte befinden. Dies wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß ein kleines Probenvolumen vorzugsweise zwischen 0,05 und 10 Femtoliter untersucht wird und durch eine geeignete Verfahrensführung sichergestellt wird, daß sich im bestrahlten Probenvolumen im wesentlichen nur Moleküle gleicher Fluoreszenzlebensdauer befinden. Erfindungsgemäß ist es weiterhin wichtig, daß die Messungen an dem Probenvolumen inner-

halb einer kurzen Zeitspanne, vorzugsweise innerhalb weniger als 50 Millisekunden, stattfinden, damit sich Diffusionsprozesse nicht störend auswirken.

Fluoreszenzfarbstoffe, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, besitzen weiterhin eine ausreichend hohe Photostabilität, d. h. die Farbstoffe überstehen eine hohe Zahl von Anregungs- und Zerfallszyklen, ohne sich zu zersetzen. Als besonders geeignet haben sich die in der EP-A-0 563 998 genannten Farbstoffe erwiesen. Geeignete Farbstoffe können insbesondere aus der Klasse der Rhodaminderivate, Oxazin und Carbocyclamine ausgewählt werden. Vorteilhaft werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung mindestens 2 Arten von fluoreszierenden Molekülen eingesetzt, deren Fluoreszenzlebensdauer verschieden ist. Im Regelfall bedeutet dies, daß die fluoreszierenden Molekülgruppen als solche unterschiedlich sind. Es sind erfindungsgemäß jedoch auch Unterscheidungen möglich, bei denen die fluoreszierenden Molekülgruppen identisch sind, jedoch durch die Wechselwirkung von fluoreszierender Molekülgruppe und dem Molekül, an das sie gebunden ist, eine detektierbare Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer erfolgt.

Ein System zur Unterscheidung von Fluoreszenzfarbstoffen durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung besitzt eine Lichtquelle, mit der ein erstes Probenvolumen bestrahlt wird. Geeignete Lichtquellen sind insbesondere Laser, vorzugsweise Diodenlaser und auch Blitzlampen. Die Lichtquellen müssen ausreichend leistungsstark und mit hoher Frequenz repetierbar sein. Letztere Eigenschaft ist dann gegeben, wenn die Lichtquelle sowohl kurzzeitig aktiviert als auch gelöscht werden kann. Vorzugsweise liegt die Repetitionsfrequenz der verwendeten Lichtquellen oberhalb 10 MHz und besitzt Pulshalbwertszeiten von weniger als 1 Nanosekunde. Der Emissionsbereich verwendeter Lichtquellen wird so gewählt, daß im Absorptionsbereich der Fluoreszenzfarbstoffe eine ausreichende Lichtleistung, vorzugsweise oberhalb 100 mW, vorhanden ist. Andererseits können auch bei Vorhandensein einer geeigneten Lichtquelle die Fluoreszenzfarbstoffe so ausgewählt werden, daß ihr Absorptionsbereich geeignet ist.

Aufgrund der hauptsächlichen Verwendung des erfindungsgemäßen Systems für wäßrige Lösungen sind Lichtquellen mit Emissionswellenlängen oberhalb 600 nm bevorzugt. Insbesondere hat sich eine Anwendung der vorliegenden Erfindung im nahen Infrarotgebiet als vorteilhaft erwiesen, da hier einerseits geringe Fluoreszenzhintergrundstrahlungen durch die

Probe auftreten als auch geeignete Farbstoffe mit unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern vorhanden sind. In dem besonders bevorzugten Wellenlängenbereich von 630 bis 670 nm gibt es nur sehr wenige Moleküle, die zur Fluoreszenz angeregt werden können, daher ist in diesem Bereich die natürliche Untergrundfluoreszenz besonders gering.

Die Bestrahlung des ersten Probevolumens mit der Lichtquelle kann direkt, d. h. ohne eine zwischengeschaltete Optik, erfolgen, wenn der von der Lichtquelle ausgesandte Lichtstrahl bereits ausreichend stark fokussiert ist, um das erfindungsgemäß verwendete, sehr kleine Probevolumen zu gewährleisten. Vorzugsweise wird jedoch der Anregungslichtstrahl durch eine mikroskopische Optik auf einen Probenbereich fokussiert. Es ist vorteilhaft, von der Probe emittierte Fluoreszenzstrahlung durch dieselbe Mikroskopoptik aufzufangen und auf einen Detektor zu leiten. Durch die Verwendung der selben Optik für die Einkoppelung des Anregungslichtes und Auskoppelung der Fluoreszenzstrahlung kann gewährleistet werden, daß die detektierten Signale aus einem eng begrenzten Raumbereich stammen. Bei Verwendung einer mikroskopischen Optik ist der Raumbereich in Richtung des Strahles durch die abnehmende Schärfe mit räumlicher Entfernung von der Fokalebene durch eine Blende begrenzt. In der Ebene senkrecht zum Lichtstrahl ist das Probevolumen durch die Güte der Fokussierung und der Blende begrenzt.

Bestrahlung der Probe und Detektion von Fluoreszenzstrahlung wird erfindungsgemäß so vorgenommen, daß ein erstes Probevolumen bestrahlt wird und Fluoreszenzstrahlung aus einem zweiten Probevolumen detektiert wird, das zumindest teilweise mit dem ersten Probevolumen überlappt. Eine besonders gute Überlappung von bestrahltem und ausgewertetem Probenbereich kann erzielt werden, wenn sowohl Einkoppelung des Anregungslichtes als auch Auskoppelung der Fluoreszenzstrahlung durch die gleiche Optik erfolgt.

Alternativ zu der vorstehend genannten Ausführungsform kann die Bestrahlung der Probe in einer ersten Richtung mit der Lichtquelle erfolgen und emittierte Fluoreszenzstrahlung davon unabhängig aus einer zweiten Richtung mit einer Mikroskopoptik aufgefangen werden. Vorzugsweise wird hierbei in einer sogenannten 90°-Anordnung gearbeitet, d. h. Anregungs- und Detektionsstrahl bilden einen rechten Winkel zueinander.

Von der Probe ausgehende Fluoreszenzstrahlung wird durch ein optisches System, vorzugsweise eine Mikroskopoptik, auf den Detektor geleitet. Im Detektionsstrahlengang

können gegebenenfalls optische Filter eingebracht werden, die Hintergrundstrahlung herausfiltern. Es ist jedoch ein Vorteil der vorliegenden Erfindung, daß auf optische Filter verzichtet werden kann. Bei Verwendung einer Mikroskopoptik zur Aufnahme emittierter Fluoreszenz wird das von der Mikroskopoptik ausgehende Strahlenbündel durch ein weiteres optisches System auf den Detektor fokussiert. Bei dieser sogenannten konfokalen Anordnung ist es möglich, Detektoren mit kleiner aktiver Fläche einzusetzen. Der Querschnitt der Detektorfläche liegt dabei vorzugsweise unterhalb 500  $\mu\text{m}$ . Geeignete Detektoren verfügen ferner über eine hohe Photonenachweisempfindlichkeit, um mit den bei der gewählten Anordnung auftretenden geringen Intensitäten eine Auswertung zu ermöglichen. Geeignet sind besonders Halbleiter Silizium-Detektoren aufgrund ihrer hohen Quanteneffizienz von bis zu 80 % im NIR-Bereich. Werden hingegen Photomultiplier eingesetzt, die eine verhältnismäßig große aktive Detektorfläche aufweisen, so wird die Flächenbegrenzung durch einen Raumfilter (Pinhole) im Strahlengang vorgenommen.

Der Detektor wird aktiviert, nachdem die Lichtquelle aktiviert war und eine Karenzzeit  $T_2$  verstrichen ist. Die Aktivierungszeit des Detektors liegt im Bereich von 1 ns während die Zeitauflösung der detektierten Signale bei etwa 300 ps liegt. Die Deaktivierung des Detektors kann längere Zeit in Anspruch nehmen, sollte jedoch 10 ns nicht überschreiten.

Die Signale des Detektors werden durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen. Eine Aufnahmeeinheit besitzt einen sehr schnellen Konverter zur Umwandlung analoger Detektorsignale in digitale Werte, die gespeichert werden. Eine Auswertung der digitalen Werte wird vorzugsweise in Echtzeit vorgenommen, kann jedoch auch zeitlich verzögert erfolgen. Zur Auswertung der digitalen Werte kann ein gewöhnlicher Mikroprozessor verwendet werden.

Die im Zeitintervall  $T_3$  erhaltenen Detektorsignale werden, gegebenenfalls nach Digitalisierung und weiterer elektronischer Bearbeitung, in Speicherzellen abgelegt, die einzelnen Zeitintervallen zugeordnet sind. Ein derartiger Speicher besitzt beispielsweise 100 oder mehr Speicherzellen, die aufeinanderfolgenden Zeitintervallen zugeordnet sind. Ein solches Zeitintervall liegt vorzugsweise im Bereich von 0,01 bis 1 Nanosekunden. Findet die Detektion eines Fluoreszenzprozesses beispielsweise 5 Nanosekunden nach Bestrahlung statt, so wird in der Speicherzelle, die eine Zerfallszeit von 5 Nanosekunden mit umfaßt, ein Wert gespeichert. Der Wert kann zu der detektierten Signalthöhe proportional sein, vorzugsweise

wird jedoch ein Einheitswert abgespeichert, der anzeigt, daß ein Fluoreszenzprozeß mit einer Lebensdauer in dem von der Speicherzelle abgebildeten Lebensdauerintervall aufgetreten ist. Besonders bevorzugt kann das vom Detektor erhaltene Signal auch bezüglich der Signalintensität analysiert und festgestellt werden, von wievielen Einzelmolekülen das Signal ausgegangen ist. In der Speicherzelle wird nunmehr das der Molekülzahl entsprechende Vielfache des Einheitswertes abgespeichert.

Der vorangehend beschriebene Speicherprozeß erfolgt für jede der Einzelmessungen erneut, wobei eine Summation vorgenommen wird. Das heißt, der nach einer Messung in einer bestimmten Speicherzelle abzuspeichernde Einheitswert, oder gegebenenfalls ein Vielfaches davon, wird dem in der Zelle bereits vorhandenen Wert zugeschlagen. Die Summenkurve, die auf diese Weise mit den Messungen für ein bestimmtes Probevolumen erhalten wird, kann ausgewertet werden, um zu ermitteln, welche fluoreszierende(n) Molekülgruppe(n) im Probevolumen enthalten sind. Auf die Summenkurve können prinzipiell solche Auswerteverfahren angewandt werden, wie sie auch für Signalkurven eingesetzt werden, die mit einem großen Molekülensemble erhalten wurden. Eine absolute Erfassung der Fluoreszenzereignisse auf wenige zehn Picosekunden genau, erlaubt eine globale Analyse der Photonenstatistik. Es können charakteristische Häufungen oder Pausen in der globalen Photonenverteilung erkannt und ermittelt werden. Es wird dadurch die Messung der Triplettlebensdauer eines Systems sowie die Ermittlung von Reaktionskinetiken möglich. Ebenso lassen sich auf diese Weise Diffusionszeiten durch das Detektionsvolumen messen, die einen Rückschluß auf die Größe des Analytmoleküls ermöglichen. Bevorzugte Auswerteverfahren für die mit erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Summenkurven werden im Folgenden beschrieben.

Mit einem erfindungsgemäßen System kann eine Gesamt-Photonensammelleffizienz von 5 bis 10 % bezogen auf die eingestrahlte Photonenanzahl erreicht werden. Dies ergibt sich aus einer Absorptionseffizienz der Fluoreszenzfarbstoffe von etwa 80 %, einer Emissionswahrscheinlichkeit von etwa 90 % und einer Detektorempfindlichkeit von bis zu 70 %. Es wurde gefunden, daß etwa 200 detektierte Fluoreszenzereignisse ausreichen, um die Unsicherheit der Unterscheidung unterhalb  $10^{-4}$  zu drücken. Bei Konzentrationen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-12}$  mol/l sind dafür 5.000, besser 10.000 Messungen am gleichen Probevolumen ausreichend. Daraus ergibt sich, daß ein Probevolumen mit Meßzyklen im MHz-Bereich erfindungsgemäß

innerhalb weniger Millisekunden oder darunter untersucht werden kann. Es wurde gefunden, daß für das Auftreten eines Fluoreszenzereignisses der folgende Zusammenhang zwischen Konzentration  $c$  [mol/l], Meßdauer  $T$  [s] und Detektionsvolumen  $V$  [l] besteht:

$$c = 1/(v \cdot T) \cdot 10^{-26} \text{ mol} \cdot \text{s}$$

Unter Meßdauer  $T$  wird  $T_3 \cdot A$  verstanden, wobei  $A$  die Zahl der Zyklen ist, mit der Aktivierung und Detektion erfolgen.

Bei Kenntnis der zu erwartenden Konzentration können Detektionsvolumen und/oder Meßdauer so gewählt werden, daß eine zur Auswertung ausreichende Zahl von Fluoreszenzereignissen erhalten wird.

Ein System gemäß der Erfindung beinhaltet weiterhin eine Steuereinheit, die dazu ausgelegt ist, die Lichtquelle für ein Zeitintervall  $T_1$  zu aktivieren und nach Verstreichen eines Zeitintervalls  $T_2$  den Detektor für ein Zeitintervall  $T_3$  zu aktivieren. Eine derartige Steuereinheit ist geeignet, eine zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung zu ermöglichen. Das Zeitintervall  $T_1$ , zu dem die Lichtquelle aktiviert ist, dient dazu, Analytmoleküle in einen angeregten Zustand zu überführen, aus dem sie unter Aussendung von Fluoreszenzlicht in einen energetisch tieferen Zustand übergehen. Die Zeit  $T_1$  liegt vorzugsweise im Bereich von 100 ps. Die Karenzzeit  $T_2$  dient dazu, spontane Fluoreszenz der Probe, die nicht von den zu detektierenden Molekülgruppen ausgeht, aus der Messung auszuschließen. Vorzugsweise liegt die Zeit  $T_2$  im Bereich zwischen 0,1 und 10 ns. Während des Zeitintervalles  $T_3$  ist der Detektor aktiviert und empfängt von der Probe ausgehende Fluoreszenzstrahlung. Die Zeit  $T_3$  wird vorzugsweise zwischen 20 und 100 ns gewählt. Während dieser Zeit  $T_3$  werden die Detektorsignale bezüglich Signalthöhe und Zeitpunkt durch eine Aufnehmeinheit aufgenommen. Da die Messung an einzelnen oder zumindest sehr wenigen Molekülen durchgeführt wird, erhält man im Zeitintervall  $T_3$  keine klassische Abklingkurve der Fluoreszenz, sondern im Falle eines einzelnen Moleküls einen Signalpeak, der den Zeitpunkt bzw. das Zeitintervall, in dem das individuelle Molekül Strahlung aussendet, kennzeichnet. Dadurch, daß die Messung wiederholt durchgeführt wird, kann eine statistische Auswertung erfolgen, aus der die Fluoreszenzlebensdauer ermittelt werden kann. Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer an einem oder wenigen Molekülen ist zunächst problematisch, da

viele Moleküle bei wiederholter Anregung zerfallen und daher nicht geeignet sind, die notwendige Zahl von Meßzyklen zu überdauern, die notwendig sind, um eine Auswertung zu ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden daher bevorzugt solche fluoreszierenden Molekülgruppen eingesetzt, die mindestens 1000 Fluoreszenzzyklen überdauern. Aufgrund der bei der vorliegenden Erfindung verwendeten kleinen Probenvolumina, vorzugsweise im Bereich von 0,05 bis 10 Femtoliter, muß dafür gesorgt werden, daß das untersuchte Molekül bzw. das Molekülensemble während der Meßdauer nicht durch Strömungs- oder Diffusionsprozesse aus dem untersuchten Probevolumen hinauswandert. Diesem Umstand wurde erfindungsgemäß damit Rechnung getragen, daß pro Millisekunde mindestens 1000 Meßzyklen durchgeführt werden. Weiterhin müssen zur Auswertung der Meßergebnisse geeignete statistische Verfahren herangezogen werden.

Als zur statistischen Auswertung im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders geeignet haben sich die sogenannten Maximum-Likelihood-Methode sowie die Mustererkennung erwiesen. Die während der Detektionszyklen  $T_3$  erhaltenen Signale werden zur statistischen Auswertung zeitaufgelöst im Speicher aufsummiert. Das bedeutet, die in verschiedenen Meßzyklen gemessene Intensität zu einem bestimmten Zeitintervall innerhalb  $T_3$  wird addiert. Dies erfolgt für eine ausreichend große Zahl unterschiedlicher Zeitintervalle (beispielsweise 1000). Die in den einzelnen Speicherzellen enthaltenen Intensitätssummen sind proportional zur Wahrscheinlichkeit, daß das untersuchte Molekülensemble innerhalb des jeweiligen Zeitintervalles Fluoreszenzstrahlung aussendet.

Bei der Maximum-Likelihood-Methode wird nunmehr eine Fluoreszenzlebensdauer geschätzt und die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die experimentell gemessene Wahrscheinlichkeitsverteilung mit dieser Fluoreszenzlebensdauer erhalten worden wäre. Die Fluoreszenzlebensdauer, die zu der höchsten Wahrscheinlichkeit führt, wird als Maximum-Likelihood-Schätzer bezeichnet und ist das Ergebnis der statistischen Auswertung. Der Maximum-Likelihood-Schätzer wird mit den Fluoreszenzlebensdauern der unterschiedlichen Arten fluoreszierender Molekülgruppen verglichen, die bei der Untersuchung eingesetzt wurden. Die Art fluoreszierender Molekülgruppe, die möglichst nahe an dem Maximum-Likelihood-Schätzer liegt, war im untersuchten Probevolumen vorhanden.

Bei der zweiten statistischen Methode, der Mustererkennung, werden wie bereits beschrieben die Intensitäten summiert, die in einem bestimmten Zeitintervall innerhalb  $T_3$  erhalten werden. Die Mustererkennung erfolgt mit der folgenden mathematischen Formel:

$$I^*(j) = \sum_{i=1}^k n_i \ln \frac{n_i}{p_i(j)} \quad ; \quad N = \sum_i n_i$$

Hierbei ist  $N$  die Summe aller über den Zeitraum  $T_3$  gezählten Photonen. Die in einem Zeitintervall  $i$  gezählten Photonen werden mit  $n_i$  bezeichnet. Die Größe  $p_i(j)$  gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß ein Fluoreszenzereignis in das Zeitintervall  $i$  fällt, wenn die gemessene Substanz vom Typ  $j$  ist. Die Photonenzahlen  $n_i$  stellen demnach den Signalverlauf der durchgeführten Messung dar, während die  $p_i(j)$  das Muster des Signalverlaufes für eine bestimmte Substanz angeben. Mit obiger Formel wird das Molekül bzw. werden die Moleküle im vermessenen Probevolumen der Art fluoreszierender Molekülgruppe zugeordnet, für die bei Zugrundelegung des zugehörigen  $p_i(j)$  der Wert  $I^*$  am kleinsten ist.

Die vorliegende Erfindung wird anhand einiger Figuren näher erläutert:

Figur 1: Darstellung einer optischen Anordnung

Figur 2: Der der Auswertung zugrundeliegende Volumenbereich

Figur 3: Zeitlicher Verlauf des Meßverfahrens

Figur 4: Meßergebnisse aus Einzelmessungen

Figur 5: Summenkurve aus den Einzelmessungen

Figur 6: Summenkurve aus einer Vielzahl von Einzelmessungen an einem einzelnen Molekül

Figur 1 zeigt prinzipiell den optischen Aufbau eines Systems gemäß der vorliegenden Erfindung. Die Probenflüssigkeit befindet sich im dargestellten Beispiel in einer Kapillare (10), von der ein Teil des Innenraumes über eine Mikroskopoptik (1) auf einen Detektor (2) abgebildet wird. Vor dem Detektor befindet sich eine Blende (3), um Hintergrundstrahlung auszuschließen. Zwischen Mikroskopoptik (1) und Detektor (2) befindet sich ein Strahlteiler (4), über den Licht aus einer Anregungslichtquelle (5) in die Mikroskopoptik (1) ein-



gekoppelt wird. Bei der Anregungslichtquelle handelt es sich im dargestellten Beispiel um einen Diodenlaser Typ PLP 01 von Hamamatsu. Mit diesem Diodenlaser können Repetitionsraten von 10 MHz bei Pulsbreiten von  $< 100$  pSek. und Pulsspitzenleistungen von über 50 mWatt realisiert werden.

Dadurch, daß die Anregungsstrahlung über die gleiche Optik eingekoppelt wird, mit der auch die Fluoreszenzstrahlung aufgefangen wird, kann erreicht werden, daß selektiv ein sehr kleiner Bereich des Probevolumens bestrahlt und von diesem Bereich ausgehende Fluoreszenzstrahlung ausgewertet wird. Durch diese Vorgehensweise ist das untersuchte Probevolumen sehr genau räumlich definiert und eine Störung der Messung durch Fluoreszenz von außerhalb des untersuchten Bereiches kann verhindert werden.

Bei dem in Figur 1 dargestellten Detektor (2) handelt es sich um einen zeitkorrelierten Einzelphotonenzähler in Form einer Avalanche-Photodiode. Auf dem Gebiet der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie können Avalanche-Photodioden vorteilhaft eingesetzt werden, da sie im Vergleich zu Photomultipliern eine geringe Detektionsfläche aufweisen. Avalanche-Photodioden können daher insbesondere in einer konfokalen Optik eingesetzt werden, bei der sich der zu untersuchende Raumbereich des Probevolumens im Brennpunkt eines ersten Linsensystems befindet, während sich die Detektionsfläche der Photodiode im Brennpunkt eines zweiten Linsensystems befindet. Bei dieser Anordnung gelangt nur Licht aus dem gewünschten Raumbereich auf die Photodiode, womit der Untergrundanteil der Messung stark reduziert werden kann.

In der Figur 1 ist weiterhin zu erkennen, daß die Enden der Kapillare (10) in Fluidkontakt mit zwei Reservoirs stehen, in denen sich Probeflüssigkeit befindet. Die Probeflüssigkeiten sind ihrerseits mit jeweils einem Pol einer Spannungsquelle (nicht dargestellt) verbunden, so daß Analytmoleküle elektrophoretisch durch die Kapillare transportiert werden können.

Figur 2 zeigt eine Darstellung des mit der Anregungslichtquelle bestrahlten Probevolumens (erstes Probevolumen) und des zugehörigen Probevolumens (zweites Probevolumen), aus dem die Detektion vorgenommen wird. Im Idealfall überlappen die dargestellten Bereiche vollständig. Im praktisch realisierbaren Fall sind die Bereiche jedoch etwas gegeneinander verschoben, so daß sich das überlappende Probevolumen, aus dem die Messung vorgenommen wird, als Schnittmenge der beiden Volumina ergibt. Die dargestellten Verhältnisse

treten dann auf, wenn sowohl ein fokussierter Anregungslichtstrahl verwendet als auch eine konfokale Detektion vorgenommen wird. Die Begrenzung der in Figur 2 skizzierten Volumenbereiche erfolgt lateral durch den Aufbau der Abbildungsoptiken und Blenden bzw. die als Blende wirkende Diodenfläche. Transversal erfolgt die Begrenzung durch den Schärfebereich der Optik in Zusammenwirken mit einer Blende, die unscharfe Strahlen ausblendet.

Figur 3 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität über die Zeit, wie er durch Erstellung einer Summenkurve aus vielen Einzelmessungen mit erfindungsgemäßen Verfahren erhalten werden kann. Im Zeitintervall  $T_1$  erfolgt ein Anregungslichtimpuls, der eine hohe Flankensteilheit besitzt. Beim erfindungsgemäßen System kommt es nicht nur darauf an, daß die Anstiegsflanke des Anregungspulses steil ist, sondern auch daß die Löschung der Lichtquelle mit sehr hoher Geschwindigkeit erfolgt. Insbesondere soll der Zeitraum  $T_1$  klein sein im Verhältnis zur Fluoreszenzlebensdauer. Auf den Anregungslichtpuls folgt die Zeit  $T_2$ , in der weder Lichtquelle noch Detektor aktiviert sind, um spontane Untergrundfluoreszenz, die in diesen Zeitraum fällt, auszublenden. Die Summenkurve im Zeitintervall  $T_3$  gibt statistisch das Abklingen der Fluoreszenzemission über die Zeit wieder. Aus der Summenkurve kann die Fluoreszenzlebensdauer der fluoreszierenden Molekülgruppen ermittelt werden.

Figur 4 zeigt Meßergebnisse, die an demselben Molekül gewonnen wurden. Auf der X-Achse der Einzelabbildungen ist die Zeit dargestellt, die nach Bestrahlung des Moleküls mit der Lichtquelle vergangen ist. Auf der Y-Achse wird ein Einheitswert für ein erhaltenes Detektionssignal abgetragen. Das in den Einzelabbildungen jeweils dargestellte grau unterlegte Kästchen gibt an, in welchem Zeitintervall nach Bestrahlung des Moleküls die von dem Molekül imitierte Fluoreszenzstrahlung gemessen wurde. Da es sich bei der Fluoreszenzemission um einen statistischen Vorgang handelt, wird die Fluoreszenzemission bei den einzelnen Experimenten auch für dasselbe Molekül nach unterschiedlichen Zeiten detektiert.

Figur 5 zeigt eine Zusammenstellung der Einzelmessungen aus Figur 4. Die bei den Einzelmessungen erhaltenen Einheitswerte werden für die einzelnen Zeiträume summiert, so daß sich ein Diagramm ergibt, das anzeigt, wie häufig ein bestimmter Bereich der Fluoreszenzlebensdauer bei den Messungen erhalten wurde.

Figur 6 zeigt eine der Figur 5 entsprechende Darstellung jedoch mit einer weiter höheren Zahl von Einzelmessung  $n$ . Die in der Figur dargestellten Punkte geben an, wie häufig ein bestimmtes Intervall der Fluoreszenzlebensdauer bei den Messungen erhalten wurde. Auf der X-Achse ist wiederum die Zeiten von Bestrahlung des Moleküls bis zur Aussendung der Fluoreszenzstrahlung aufgetragen. Die in der Figur dargestellte durchgezogene Linie stellt statistisch das Abklingen der Fluoreszenzintensität dar. Im konkreten Experiment ergibt sich die statistisch ermittelte Fluoreszenzlebensdauer zu 3,7 ns.

**Patentansprüche**

1. System zur Unterscheidung von mindestens zwei unterschiedlich fluoreszierenden Arten von Molekülgruppen, die an Analytmoleküle gebunden sind, durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung mit
  - einer Lichtquelle, die ein erstes Probevolumen mit Licht bestrahlt, das geeignet ist, die mindestens zwei Arten von Molekülgruppen zur Fluoreszenz anzuregen,
  - einem Detektor zur Detektion von aus einem zweiten mit dem ersten Probevolumen zumindest teilweise überlappenden Probevolumen emittierter Fluoreszenzstrahlung,
  - einer Steuereinheit, die dazu ausgelegt ist,
    - a) die Lichtquelle für ein Zeitintervall  $T_1$  zu aktivieren und
    - b) nach Verstreichen eines Zeitintervalles  $T_2$  den Detektor für ein Zeitintervall  $T_3$  zu aktivieren,wobei die Schritte a) und b) mindestens 1000fach pro Millisekunde durchgeführt werden, die während der Zeitintervalle  $T_3$  erhaltenen Detektorsignale durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen und durch eine Auswerteeinheit ausgewertet werden und aus den zeitlichen Signalverläufen im Zeitintervall  $T_3$  ermittelt wird, welche der mindestens zwei Molekülgruppen im überlappenden Probevolumen enthalten ist.
2. System gemäß Anspruch 1, bei dem das überlappende Probevolumen 0,05 bis 10 Femtoliter beträgt.
3. System gemäß Anspruch 1, bei dem die Schritte a) und b) für das bestrahlte Probevolumen mindestens 5000fach pro Millisekunde durchgeführt werden.
4. System gemäß Anspruch 1, bei dem die Konzentration der Analytmoleküle in der Probenflüssigkeit  $10^{-9}$  bis  $10^{-12}$  mol/l beträgt.
5. System gemäß Anspruch 1, bei dem sich im bestrahlten Probevolumen 1 bis 10 gleichartige Moleküle befinden.

6. System gemäß Anspruch 1, bei dem die Analytmoleküle Nukleinsäuren oder Fragmente davon sind.
7. System gemäß Anspruch 1 oder 6, bei dem vier verschiedene Arten fluoreszierender Molekülgruppen verwendet werden, die jeweils an eine Art von Nukleotid gebunden sind.
8. System gemäß Anspruch 1 oder 6, bei dem eine Art fluoreszierende Molekülgruppe verwendet wird, deren Fluoreszenzlebensdauer durch Wechselwirkung mit dem jeweiligen Analytmolekül bestimmt wird.
9. System gemäß Anspruch 1, bei dem die Bestrahlung des Probevolumens durch eine Mikroskopoptik erfolgt.
10. System gemäß Anspruch 1 oder 9 mit einer konfokalen optischen Abbildung zur Bestrahlung des Probevolumens und Detektion emittierter Fluoreszenz.
11. System gemäß Anspruch 1, bei dem sich das Probevolumen innerhalb eines Zylinders befindet, dessen Querschnitt kleiner als 50  $\mu\text{m}$  ist.
12. System gemäß Anspruch 1 oder 11, bei dem sich die Probe mit einer Lineargeschwindigkeit von weniger als 10 m/s bewegt.
13. System gemäß Anspruch 1, 11 oder 12, bei dem die Probe durch einen Zylinder strömt, dessen Wandung das untersuchte Probevolumen in zwei Raumrichtungen begrenzt.
14. System gemäß Anspruch 1, bei dem  $T_2$  im Bereich zwischen 0,1 und 10 ns liegt.
15. System gemäß Anspruch 1, bei dem  $T_3$  im Bereich zwischen 20 und 1000 ns liegt.
16. System gemäß Anspruch 1, bei dem die Lichtquelle ein Halbleiterlaser mit einer Wellenlänge im Bereich von 620 bis 900 nm ist.
17. Verwendung eines Systems gemäß Anspruch 1 zur Sequenzierung von Nukleinsäuren.

18. Verfahren zur Unterscheidung von mindestens zwei unterschiedlich fluoreszierenden Arten von Molekülgruppen, die an Analytmoleküle gebunden sind, durch zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung, bei dem
- mit einer Lichtquelle ein erstes Probevolumen mit Licht bestrahlt wird, das geeignet ist, die mindestens zwei Arten von Molekülgruppen zur Fluoreszenz anzuregen,
  - mit einem Detektor, aus einem zweiten, mit dem ersten Probevolumen zumindest teilweise überlappenden Probevolumen emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert wird,
  - mit einer Steuereinheit
    - a) die Lichtquelle für ein Zeitintervall  $T_1$  aktiviert wird,
    - b) nach Verstreichen eines Zeitintervalles  $T_2$  der Detektor für ein Zeitintervall  $T_3$  aktiviert wird,
- und bei dem die Schritte a) und b) mindestens 1000fach pro Millisekunde durchgeführt werden, die im Zeitintervall  $T_3$  durch die Aufnahmeeinheit aufgenommenen Detektorsignale durch eine Auswerteeinheit ausgewertet werden und aus den zeitlichen Signalverläufen im Zeitintervall  $T_3$  ermittelt wird, welche der mindestens zwei Arten von Molekülgruppen im überlappenden Probevolumen enthalten ist.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18 zur Durchführung von Immunoassays.
20. Verfahren gemäß Anspruch 18 zur Durchführung von Nukleinsäure-Hybridisierungsassays.
21. Verfahren gemäß Anspruch 18, bei dem die Auswertung der Detektorsignale im Zeitintervall  $T_3$  erfolgt.
22. Verfahren gemäß Anspruch 18, bei dem an demselben Probevolumen mindestens 5.000 Einzelmessungen mit den Schritten a) und b) durchgeführt werden.

23. Verfahren gemäß Anspruch 18, bei dem die im Zeitintervall  $T_3$  aufgenommenen Detektorsignale in einem Speicher gespeichert werden, wobei der Speicher eine Vielzahl von Speicherzellen besitzt, die aufeinanderfolgenden Zeitintervallen zugeordnet sind und die Speicherung in der Speicherzelle erfolgt, die ein Zeitintervall umfaßt, in die die bei der Messung detektierte Zeit zwischen Bestrahlung und Emission fällt.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, bei dem ein Einheitswert oder ein Vielfaches eines Einheitswertes abgespeichert wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, bei dem in dem Speicher eine Summation der abgespeicherten Werte vorgenommen wird, so daß sich für die in einem Probenvolumen durchgeführten Einzelmessungen eine Summenkurve ergibt.
26. Verfahren gemäß Anspruch 25, bei dem die Summenkurve statistisch ausgewertet wird, um eine Fluoreszenzlebensdauer zu ermitteln und damit die im Probenvolumen vorliegende Molekülgruppe zu identifizieren.

Fig 1

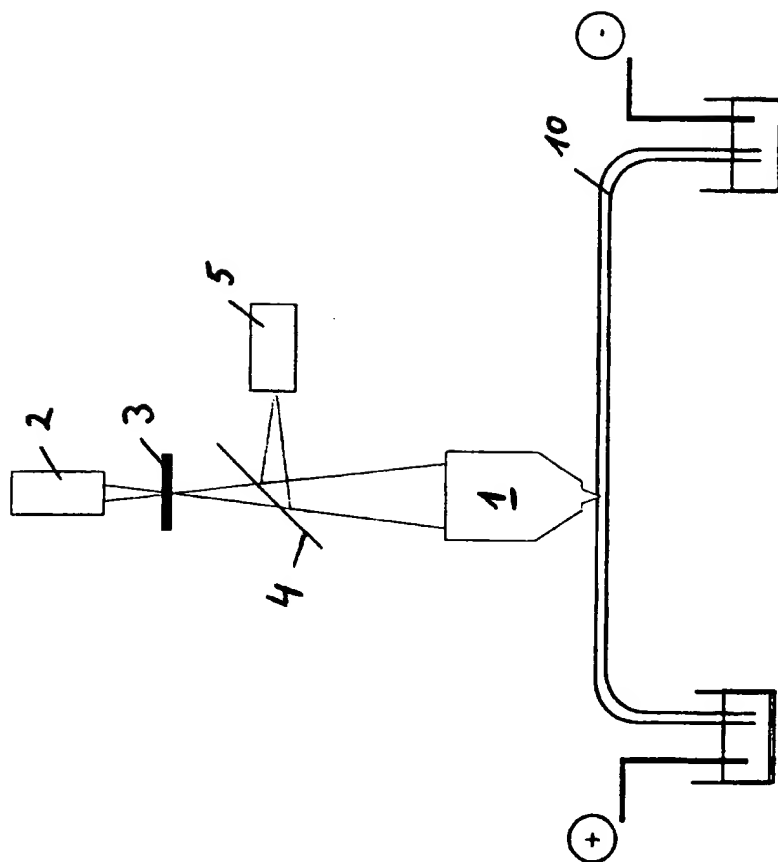
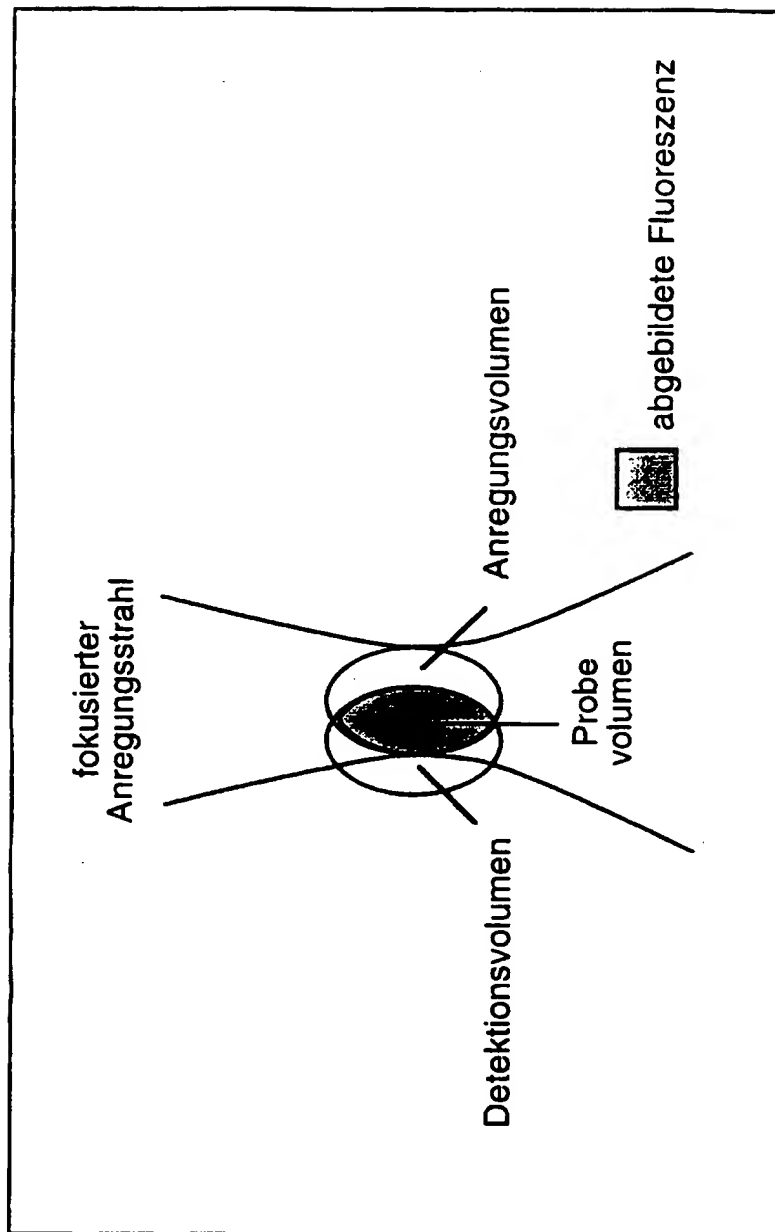




Fig 2



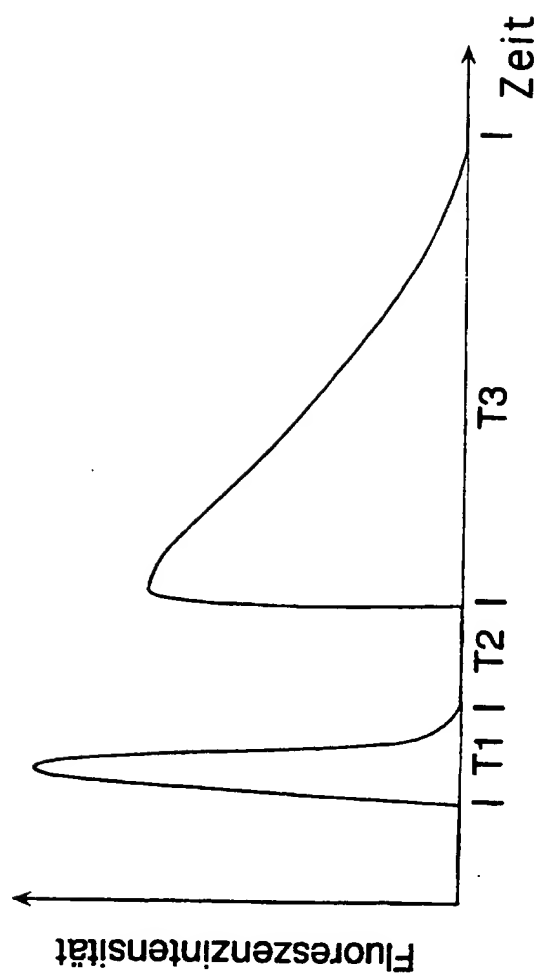
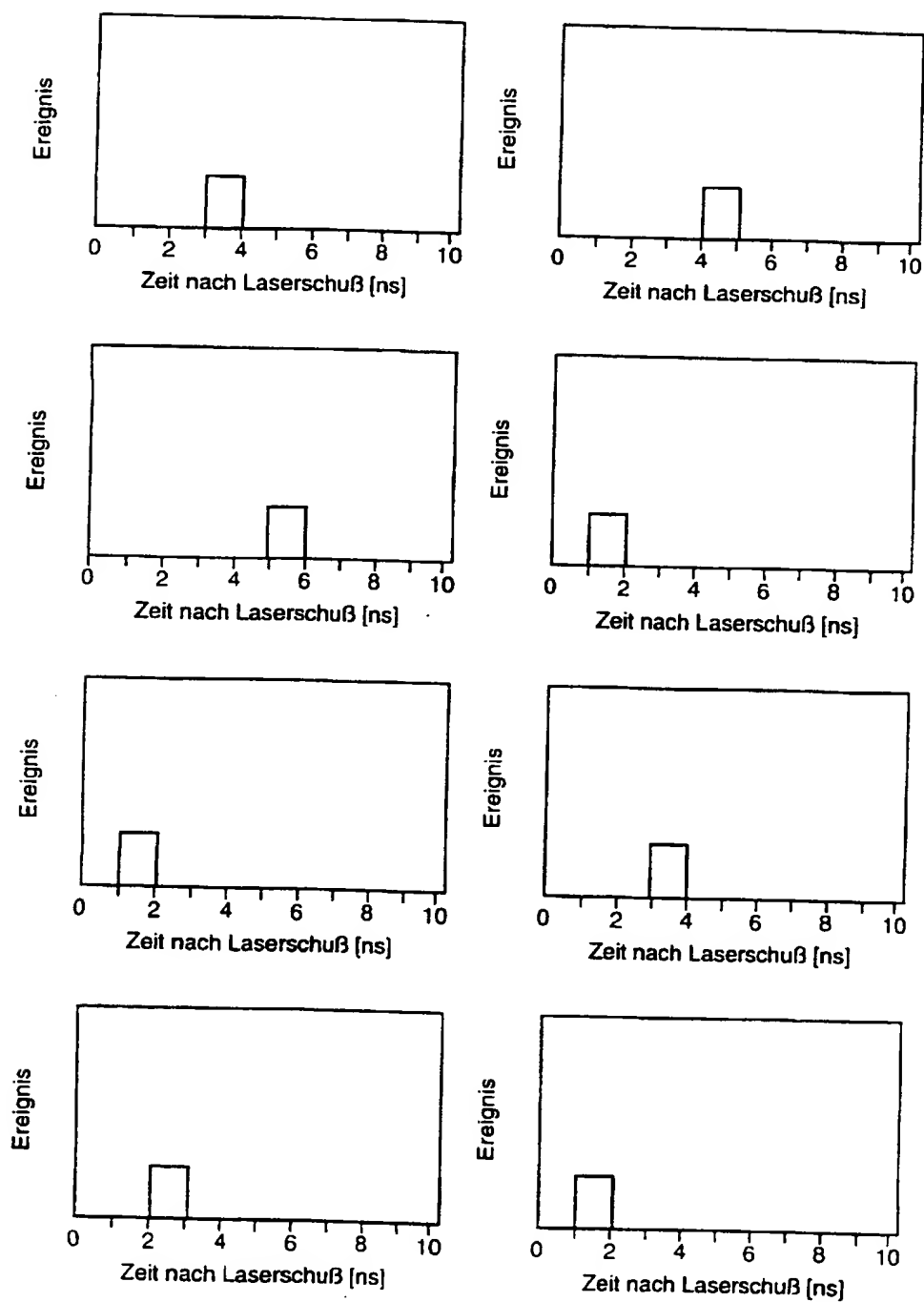


Fig 3

Fig 4



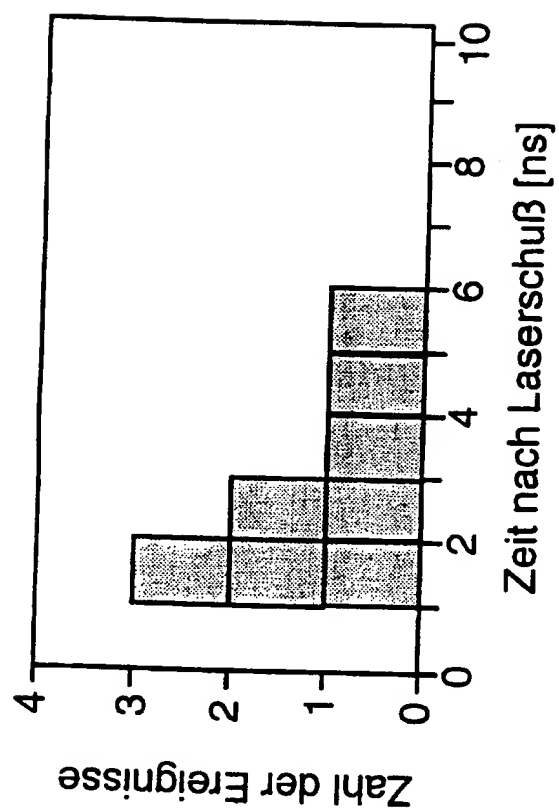


Fig 5

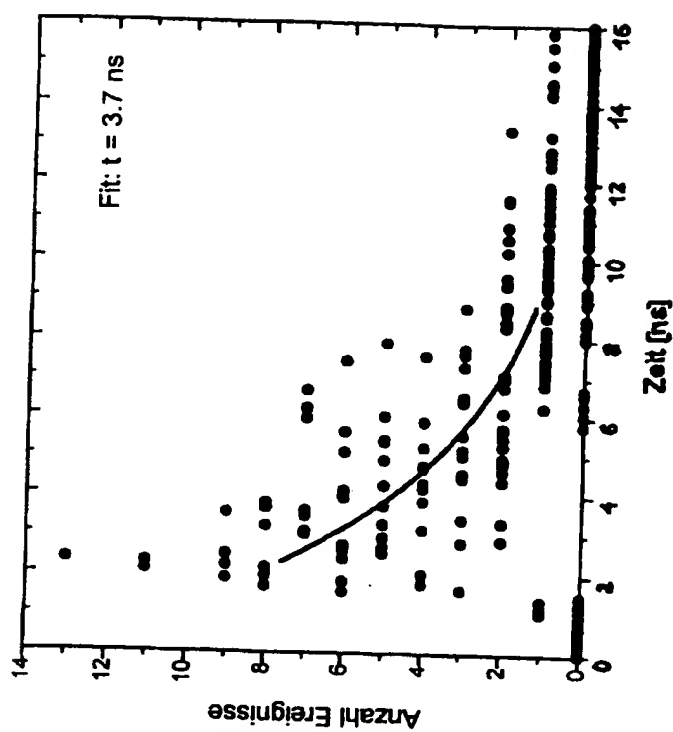


Fig 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04665

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N21/64 G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 93 19358 A (DIATRON CORP) 30 September 1993</p> <p>see page 1, line 2 - line 5  see page 2, line 17 - line 22  see page 5, line 20 - page 6, line 10  see page 9, line 6 - line 22  see page 13, line 6 - line 33  see page 15, line 13 - page 16, line 10  see table 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1, 3, 4,  6-8,  15-19,  22, 23, 25</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 December 1997

Date of mailing of the international search report

18/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04665

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 563 998 A (SAUER MARKUS ;DREXHAGE KARL HEINZ (DE); HAN KYUNG TAE (DE); KOELLN) 6 October 1993 cited in the application see page 3, line 1 - line 4 see page 3, line 45 - page 4, line 9 see page 4, line 37 - page 5, line 2 ---	1,3,4, 6-8, 15-19, 22,23,25
A	EP 0 257 559 A (BECTON DICKINSON CO) 2 March 1988 see column 3, line 46 - column 4, line 25 ---	1,18,19
A	KELLER R A ET AL: "SINGLE-MOLECULE FLUORESCENCE ANALYSIS IN SOLUTION" APPLIED SPECTROSCOPY, vol. 50, no. 7, July 1996, pages 12A-32A, XP000642337 see page 13A, right-hand column, paragraph 2 - page 15A, middle column, paragraph 1 see page 21A, middle column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 see page 30A, middle column, paragraph 2 - page 31A, left-hand column, paragraph 2 ---	1,5,6,9, 10,12, 17,18
A	GHIGGINO K P ET AL: "FLUORESCENCE LIFETIME MEASUREMENTS USING A NOVEL FIBER-OPTIC LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE" REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, vol. 63, no. 5, 1 May 1992, pages 2999-3002, XP000301230 see page 2999, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 3 see figure 1 ---	9,10
A	US 5 252 834 A (LIN RUI) 12 October 1993 cited in the application see claims 1,2,4,5,10 -----	1,9,15, 16,18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04665

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9319358 A	30-09-93	US 5323008 A	21-06-94
		CA 2132707 A	30-09-93
		EP 0632887 A	11-01-95
		JP 7505467 T	15-06-95
EP 0563998 A	06-10-93	DE 4210970 A	07-10-93
EP 0257559 A	02-03-88	US 4745285 A	17-05-88
		JP 63118638 A	23-05-88
US 5252834 A	12-10-93	NONE	



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04665

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 G01N21/64 G01N33/533

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WO 93 19358 A (DIATRON CORP) 30. September 1993</p> <p>siehe Seite 1, Zeile 2 - Zeile 5  siehe Seite 2, Zeile 17 - Zeile 22  siehe Seite 5, Zeile 20 - Seite 6, Zeile 10  siehe Seite 9, Zeile 6 - Zeile 22  siehe Seite 13, Zeile 6 - Zeile 33  siehe Seite 15, Zeile 13 - Seite 16, Zeile 10  siehe Tabelle 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1,3,4, 6-8, 15-19, 22,23,25</p>

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
3. Dezember 1997	18/12/1997
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Krametz, E

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04665

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 563 998 A (SAUER MARKUS ;DREXHAGE KARL HEINZ (DE); HAN KYUNG TAE (DE); KOELLN) 6.Oktober 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 3, Zeile 1 - Zeile 4 siehe Seite 3, Zeile 45 - Seite 4, Zeile 9 siehe Seite 4, Zeile 37 - Seite 5, Zeile 2 ---	1,3,4, 6-8, 15-19, 22,23,25
A	EP 0 257 559 A (BECTON DICKINSON CO) 2.März 1988 siehe Spalte 3, Zeile 46 - Spalte 4, Zeile 25 ---	1,18,19
A	KELLER R A ET AL: "SINGLE-MOLECULE FLUORESCENCE ANALYSIS IN SOLUTION" APPLIED SPECTROSCOPY, Bd. 50, Nr. 7, Juli 1996, Seiten 12A-32A, XP000642337 siehe Seite 13A, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 15A, mittlere Spalte, Absatz 1 siehe Seite 21A, mittlere Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 2 siehe Seite 30A, mittlere Spalte, Absatz 2 - Seite 31A, linke Spalte, Absatz 2 ---	1,5,6,9, 10,12, 17,18
A	GHIGGINO K P ET AL: "FLUORESCENCE LIFETIME MEASUREMENTS USING A NOVEL FIBER-OPTIC LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE" REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS, Bd. 63, Nr. 5, 1.Mai 1992, Seiten 2999-3002, XP000301230 siehe Seite 2999, linke Spalte, Absatz 1 - rechte Spalte, Absatz 3 siehe Abbildung 1 ---	9,10
A	US 5 252 834 A (LIN RUI) 12.Oktober 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1,2,4,5,10 -----	1,9,15, 16,18

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04665

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9319358 A	30-09-93	US 5323008 A CA 2132707 A EP 0632887 A JP 7505467 T	21-06-94 30-09-93 11-01-95 15-06-95
EP 0563998 A	06-10-93	DE 4210970 A	07-10-93
EP 0257559 A	02-03-88	US 4745285 A JP 63118638 A	17-05-88 23-05-88
US 5252834 A	12-10-93	KEINE	